

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22680063

研究課題名（和文） 形態学を基盤とする独自の統合的解析法による新規チロシンキナーゼ融合遺伝子の同定

研究課題名（英文） Identification of novel tyrosine kinase fusion genes using a unique system based on morphology

研究代表者

竹内 賢吾（TAKEUCHI KENGO）

公益財団法人がん研究会・がん研究所病理部・主任研究員

研究者番号：40323612

研究成果の概要（和文）：

炎症性筋線維芽細胞腫における PPFIBP1-ALK、腎癌における TPM3-ALK、EML4-ALK を新規同定した。リンパ腫においては、SQSTM1-ALK を新規同定している。また、融合遺伝子の同定法として RACE 法をホルマリン固定・パラフィン包埋検体用に最適化し、肺癌において KLC1-ALK を同定した。病理組織学的手法を基盤とした他に類を見ない融合遺伝子探索システムを構築し、肺癌において ROS1 融合遺伝子 4 種、RET 融合遺伝子 2 種を新規同定した。また、IRF4 転座により規定される新規低悪性度 B 細胞性リンパ腫の提唱をおこなった。

研究成果の概要（英文）：

We identified PPFIBP1-ALK in inflammatory myofibroblastic tumor and TPM3-ALK and EML4-ALK in renal cell carcinoma. In lymphoma, we found SQSTM1-ALK. KLC1-ALK was identified from a formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue by RACE optimized for FFPE. We established a unique system for identification of fusion genes based on histopathological methods, and identified 4 ROS1 and 2 RET novel fusion genes. We also proposed a new entity of low-grade B-cell lymphoma, which was characterized by IRF4 rearrangement.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2011年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2012年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
年度			
年度			
総計	19,300,000	5,790,000	25,090,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：がん、チロシンキナーゼ、融合遺伝子

1. 研究開始当初の背景

2007年、自治医科大学の Soda らは、受容体型 TK である ALK が、代表的な上皮性悪性腫瘍である肺癌において染色体転座の結果、強力な融合型癌遺伝子 EML4-ALK となることを報告した。Soda らの成果を受けて申請者は、いち早く EML4-ALK 肺癌の診断法の開発に取

りかかり、2ヶ月で RT-PCR 法による効率的検出法、免疫染色による実用的検出法を世界に先駆けて確立した。具体的検出法として RT-PCR、免疫染色、FISH などが考えられるが、EML4-ALK が有する特徴によりいずれの方法にも困難さが伴っている。まず、EML4-ALK の融合点は多彩であり、PCR primer の設定に工

夫が必要である。申請者は理論的にありえるすべての融合パターンを検出できる multiplex RT-PCR 法を開発し、そのときまでに判明していた4種類の融合バリエーションのほか、新たに5種類を同定した。免疫染色法は臨床現場で汎用される極めて簡便な方法であるが、EML4-ALK に対する抗 ALK 免疫染色は有用でないという報告が他の研究者より出されていた。申請者は iAEP 法と名づけた簡便な独自の免疫染色増感法を開発し効率的な ALK 免疫染色法を確立した。またこの方法を用いてスクリーニングした症例中に新たに KIF5B-ALK 融合遺伝子を新規同定した。FISH 法に関しては EML4、ALK は遺伝子座が近く split、fusion の両アッセイともに判定が困難である。申請者はプローブの設計を工夫し検出感度を高める系を開発した。その他、上記の診断法により同定した症例群を用いた臨床病理学的検討をおこない、自治医科大学グループが作成した EML4-ALK トランスジェニックマウスの組織学的解析を担当し病態の解明に寄与した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、固形癌において、新しいチロシンキナーゼ (TK) 融合遺伝子を同定することにある。TK 融合遺伝子は多くの場合がんの第一義的病因であり、多くの阻害剤が存在または開発中であるので、その発見はがんの診断および治療の革新的進歩に直結する。申請者は、新規 TK 融合遺伝子を同定してきた。また、自ら開発した ALK 融合遺伝子陽性肺癌の診断法により診断された幾人かの患者は、新規 ALK 阻害剤の治療に参加した。ALK 肺癌研究会の設立・運営や講演活動を通じこれらの from bench to bed ともいふべき貴重な経験を国民の福祉に還元することに努めている。既に同定、または今後同定される TK 融合遺伝子に関しても同等以上の社会貢献につなげたい。

3. 研究の方法

計画 以下に述べた方法を、各癌腫、各 TK に適応していく探索的研究である。これまでの癌種とともに、腎癌、大腸癌、膵癌を加えていく予定である。

方法

- #1. フォルマリン固定パラフィン包埋ブロックより径 1mm 大の組織アレイを癌種ごとに作成する。
- #2. 組織アレイに代表的チロシンキナーゼ (数十種) に対する split FISH を施行する。
- #3. 2 で得られた候補症例に対し、5' -RACE、inverse RT-PCR 法により fusion partner を同定。
- #4. 融合遺伝子の完全長 cDNA を取得し癌化

能の証明をおこなう (focus formation assay、ヌードマウス造腫瘍 assay、in vitro kinase assay、および IL3 依存性 BA/F3 細胞を用いたサイトカイン非依存性増殖の確認など)。
#5. 完全長 cDNA を導入したトランスジェニックマウスを作成し、in vivo での造腫瘍能の確認、キナーゼ阻害剤を用いた治療効果実験を行う。

4. 研究成果

ALK 融合遺伝子に関しては、炎症性筋線維芽細胞腫における PPFIBP1-ALK (論文 13)、腎癌における TPM3-ALK, EML4-ALK (8) を新規同定した。リンパ腫においては、SQSTM1-ALK を新規同定している (12)。また、融合遺伝子の同定法として RACE 法をホルマリン固定・パラフィン包埋検体 (FFPE) 用に最適化し、肺癌において KLC1-ALK を同定した (5)。これは FFPE 検体のみを用いて新規融合遺伝子を同定した世界初の事例であると思われる。臨床現場では、固形癌において摘出された検体の凍結保存がルーチンで行われている施設は大学病院など研究を行う少数の施設のみである。一方、大半の施設では、すべてがホルマリン固定され病理診断に供される。したがって FFPE 検体は、どこの施設においても一定期間から半永久的に保管されている。FFPE 検体可能な解析法を開発することは、研究に使用できる検体量を事実上 100 倍以上増加させることに等しく意義深い。

病理組織学的手法を基盤とした他に類を見ない融合遺伝子探索システムを構築し、検索対象を様々な癌種、キナーゼ分子に展開している。肺癌において ROS1 融合遺伝子 4 種、RET 融合遺伝子 2 種を新規同定した (6)。このことは各種メディアにより広く国内外に報道された。

また、キナーゼではないが本研究と類似の手法により IRF4 転座により規定される新規低悪性度 B 細胞性リンパ腫の提唱をおこなった (2)。

これらの他、共同研究による成果を多数論文文化した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

- ① Kozu Y, et al. 5人中4番目、Epithelioid inflammatory myofibroblastic sarcoma arising in the pleural cavity. *General Thoracic Cardiovascular Surgery*. 2013、査読有、DOI:10.1007/s11748-013-0204-x
- ② Takeuchi K, et al. A low-grade B-cell lymphoma with polyclonal B-cell population and immunoblastic features.

- proliferation and IRF4 rearrangement. *Haematologica*. 2013, 98, e32-35、 査読有、 DOI:10.3324/haematol.2012.076851
- ③ Ninomiya H, et al. 13人中4番目、 Allelotypes of lung adenocarcinomas featuring ALK fusion demonstrate fewer oncogene and suppressor gene changes. *BMC Cancer*. 2013, 13, 8、 査読有、 DOI:http://www.biomedcentral.com/1471-2407/13/8
- ④ Soda M, et al. 15人中10番目、 A Prospective PCR-Based Screening for the EML4-ALK Oncogene in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2012, 18, 5682-5689、 査読有、 DOI:10.1158/1078-0432.CCR-11-2947
- ⑤ Togashi Y, et al. 9人中9番目、 KLC1-ALK: a novel fusion in lung cancer identified using a formalin-fixed paraffin-embedded tissue only. *PLoS One*. 2012, 7, e31323、 査読有、 DOI:10.1371/journal.pone.0031323.g001
- ⑥ Takeuchi K, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nature Medicine*. 2012, 18, 378-381、 査読有、 DOI:10.1038/nm.2658
- ⑦ Yamamoto M, et al. 9人中2番目、 Small non-mucinous bronchioloalveolar carcinoma with anaplastic lymphoma kinase immunoreactivity: A novel ALK fusion gene? *Cancer Science*. 2012, 103, 390-392. 査読有、 DOI:10.1111/j.1349-7006.2011.02136.x
- ⑧ Sugawara E, et al. 12人中12番目、 Identification of anaplastic lymphoma kinase fusions in renal cancer: Large-scale immunohistochemical screening by the intercalated antibody-enhanced polymer method. *Cancer*. 2012, 118, 4427-4436. 査読有、 DOI:10.1002/cncr.27391
- ⑨ Kimura H, et al. 16人中3番目、 ALK fusion gene positive lung cancer and 3 cases treated with an inhibitor for ALK kinase activity. *Lung Cancer*. 2012, 75, 66-72、 査読有、 DOI:10.1016/j.lungcan.2011.05.027
- ⑩ Kijima T, et al. 13人中2番目、 Favorable response to crizotinib in three patients with echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase fusion-type oncogene-positive non-small cell lung cancer. *Cancer Science*. 2011, 102, 1602-1604、 査読有、 DOI:10.1111/j.1349-7006.2011.01970.x
- ⑪ Okuda C, et al. 8人中3番目、 Successful treatment with pemetrexed in a patient with mucinous bronchioloalveolar carcinoma: long-term response duration with mild toxicity. *Journal of Thoracic Oncology*. 2011, 6, 641-642、 査読有、 DOI:10.1097/JTO.0b013e3182037c80
- ⑫ Takeuchi K, et al. Identification of a novel fusion, SQSTM1-ALK, in ALK-positive large B-cell lymphoma. *Haematologica*. 2011, 96, 464-467、 査読有、 DOI:10.3324/haematol.2010.033514
- ⑬ Takeuchi K, et al. Pulmonary inflammatory myofibroblastic tumor expressing a novel fusion, PPFIBP1-ALK: reappraisal of anti-ALK immunohistochemistry as a tool for novel ALK fusion identification. *Clinical Cancer Research*. 2011, 17, 3341-3348、 査読有、 DOI:10.1158/1078-0432.CCR-11-0063
- ⑭ Choi YL, et al. 15人中8番目、 EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *The New England Journal of Medicine*. 2010, 363, 1734-1739、 査読有、 DOI:10.1056/NEJMoa1007478
- ⑮ Jokoji R, et al. 7人中6番目、 Combination of morphological feature analysis and immunohistochemistry is useful for screening of EML4-ALK-positive lung adenocarcinoma. *Journal of Clinical Pathology*. 2010, 63, 1066-1070. 査読有、 DOI:10.1136/jcp.2010.081166
- ⑯ Mano H, Takeuchi K. EML4-ALK fusion in lung. *American Journal of Pathology*. 2010, 176, 1552-1553、 author reply 1553-1554、 査読有、 DOI:10.2353/ajpath.2010.091057
- ⑰ Nakajima T, et al. 7人中3番目、 Treatment of lung cancer with an ALK inhibitor after EML4-ALK fusion gene detection using endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration. *Journal of Thoracic Oncology*. 2010, 5, 2041-2043、 査読有、 DOI:10.1097/JTO.0b013e3181f77b58
- ⑱ Sakairi Y, 12人中7番目、 EML4-ALK fusion gene assessment using metastatic lymph node samples obtained by endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration. *Clinical Cancer Research*. 2010, 16, 4938-4945、 査読有、 DOI:10.1158/1078-0432.CCR-10-0099

〔学会発表〕(計 18 件)

- ①竹内賢吾、新しい肺癌の融合遺伝子、第 97 回日本肺癌学会関西支部会、2013 年 2 月 9 日、薬業年金会館
- ②竹内賢吾、病理医による疾患と病因の発見、第 58 回日本病理学会秋期特別総会、2012 年 11 月 22 日、ういんく愛知
- ③竹内賢吾、Novel fusions in lung cancer、第 53 回日本肺癌学会、2012 年 11 月 9 日、ホテルグランヴィア岡山
- ④竹内賢吾、ALK fusions、第 53 回日本肺癌学会、2012 年 11 月 9 日、ホテルグランヴィア岡山
- ⑤竹内賢吾、Novel fusion kinases in lung cancer、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19 日、ホテルロイトン札幌
- ⑥竹内賢吾、融合遺伝子の発見、第 10 回日本臨床腫瘍学会学術集会、2012 年 7 月 26 日、大阪国際会議場
- ⑦竹内賢吾、ALK, ROS1, RET 融合遺伝子：がんの治療病理学の創成に向けた病理医による新規分子標的の発見、第 30 回日本眼腫瘍学会、2012 年 6 月 30 日、栃木県総合文化センター
- ⑧竹内賢吾、ALK, ROS1, RET 融合遺伝子：治療病理学の創成に向けた病理医による新規分子標的の同定、第 101 回日本病理学会総会、2012 年 4 月 27 日、京王プラザホテル
- ⑨竹内賢吾、ALK 肺癌の診断法、日本がん分子標的治療学会 (JAMTTC) - 日本遺伝子診療学会 (JSGDT) 合同シンポジウム、2011 年 12 月 9 日、都市センターホテル
- ⑩竹内賢吾、Exploring for ALKoma with use of integrated diagnostic techniques、第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 3 日、名古屋国際会議場
- ⑪竹内賢吾、基礎から学ぶ次世代の分子標的治療薬と基盤技術、第 9 回日本臨床腫瘍学会学術集会、2011 年 7 月 21 日、パシフィコ横浜
- ⑫竹内賢吾、未来とは受け入れるものではなく創り出すもの、第 51 回日本リンパ網内系学会総会、2011 年 7 月 1 日、福岡国際会議場
- ⑬竹内賢吾、Lymphomatoid Gastropathy、第 100 回日本病理学会総会、2011 年 4 月 30 日、パシフィコ横浜
- ⑭竹内賢吾、肺癌における組織像・細胞像と遺伝子変化-診断に有用な分子生物学、第 49 回日本臨床細胞学会秋期大会、2010 年 11 月 22 日、神戸
- ⑮竹内賢吾、スライドセミナーALK 肺癌、第 28 回国際病理学会総会、2010 年 10 月 12 日、ブラジル (サンパウロ)
- ⑯竹内賢吾、Large B-cell neoplasms(2)、第 50 回日本リンパ網内系学会総会、2010 年 6 月 18 日、新潟
- ⑰竹内賢吾、Through Microscope to Bench

and Bed、第 99 回日本病理学会総会、2010 年 4 月 29 日、京王プラザホテル

⑱竹内賢吾、ALK 肺癌：診断法の開発と臨床病理学的特徴、第 99 回日本病理学会総会、2010 年 4 月 27 日、京王プラザホテル

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：核酸配列の切断標識方法

発明者：竹内賢吾

権利者：公益財団法人がん研究会

種類：特許

番号：2012-176558

出願年月日：2012 年 8 月 9 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 賢吾 (Kengo Takeuchi)

公益財団法人がん研究会・がん研究所病理部・主任研究員

研究者番号：40323612